

09/446966

CT/DE 98/01902

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



RECD 12 OCT 1998
WPO PCT

Bescheinigung

Herr Johannes Christianus van Groeninghen
in Herdecke/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der
Bezeichnung

"Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-
Rezeptoren und die Verwendung von GnRH-Agonisten
und GnRH-Antagonisten zur Behandlung eines Tumors
ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder
Hirnhäuten"

am 4. Juli 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das
Symbol G 01 N 33/574 der Internationalen Patentklassifi-
kation erhalten.

München, den 3. August 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag



Keller

Aktenzeichen: 197 28 737.9



BEST AVAILABLE COPY

04.07.1997



4. Juli 1997

Neue Deutsche Patentanmeldung
Johannes Christianus van Groeninghen
U.Z.: 159-1

5

Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren und die
10 Verwendung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten zur
Behandlung eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem
und/oder den Hirnhäuten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten. Ferner betrifft die Erfindung die Bereitstellung eines Diagnostik-Kits für Tumore ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder
20 Nervensystem und/oder den Hirnhäuten.

Die postoperative Behandlung von Prostata- und Mammakarzinomen mit Agonisten des Gonadotrophin-freisetzenden Hormons (GnRH; in der Literatur gleichgesetzt mit luteinisierendem Hormon-freisetzendem Hormon; LH-RH) ist eine Standardbehandlung; vgl
25 Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92; Emons und Schally, 1994, *Human Reproduction Update* 9, Nr. 7, 1364-1379.

So ist bei verschiedenen Steroidhormon-abhängigen malignen Tumoren, wie Endometriose, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom, in klinischen Studien ein Doppeleffekt
30 bei der Behandlung mit GnRH-Agonisten festgestellt worden:

- 1) eine indirekte anti-proliferative Wirkung durch Entkoppeln der endokrinen (östrogenen oder androgenen) positiven Beeinflussung des Wachstums des Tumors,
- 2) eine direkt anti-proliferative Wirkung durch einen unbekannten Mechanismus über
GnRH-Rezeptoren im Tumorgewebe selbst; vgl. Emons und Schally, 1994, *Human Reproduction Update* 9, 1364-1379.

Die vorgenannte indirekte Wirkung aufgrund einer Steroidhormonabhängigkeit ist seit Jahrzehnten für das Prostatakarzinom und Mammakarzinom bekannt; vgl Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92; Jonat et al., 1995, *European Journal of Cancer* 31A, 137-142.

5

Die direkte anti-proliferative Wirkung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten auf z.B. Prostatakarzinome, Mammakarzinome und Ovarialkarzinome wurde in klinischen Studien bestätigt. Einige für diese Behandlung eingesetzte GnRH-Agonisten, die eine direkte anti-proliferative Wirkung besitzen, sind unter den folgenden Handelsnamen der in Deutschland zugelassenen Arzneimittel bekannt: z.B. Zoladex®, Profact®-Depot, Suprecur®, Carcinil® oder Decapeptyl®. Ein Beispiel eines in mehreren klinischen Studien erforschten GnRH-Antagonisten ist Cetrorelix®, das in Deutschland noch nicht als Arzneimittel zugelassen ist. Eine Cetrorelix®-Behandlung hat den Nachteil, daß kein Depotpräparat mit z.B. wochenlanger Wirkung existiert. Weitergehende Forschung in Zellkultur zeigte, daß GnRH-Rezeptoren auch auf primären Leberzellkarzinomen und Pancreasadenokarzinomen vorkommen. Ferner wurde eine biochemische Metabolisierung von GnRH in Ratten-Glioma und Ratten-Neuroblastoma beschrieben; vgl. Tao et al., 1991, *Neuropeptides* 20, 125-131.

Glioma werden die von der Neuroglia ausgehenden, d.h. vom Ektoderm abgeleiteten Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems, vor allem im Gehirn lokalisierten echten Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) genannt. Diese Glioma treten in unterschiedlicher Differenzierung auf. Unterarten der Glioma sind das Spongioblastom, Oligodendrogliom, Astrozytom, Glioblastom und Retinoblastom. Vor allem der Hirntumortyp des Glioblastoma multiforme (GBM) zeichnet sich durch ein sehr schnelles Wachstum und seine extrem hohe Rezidivrate (d.h. Prozentsatz von Patienten mit Hirntumortückkehr nach operativer makroskopischer Entfernung) aus.

Sowohl das im ZNS auftretende maligne Melanom, primär oder als Metastase, als auch das primär in der Haut auftretende maligne Melanom und/oder das weiter in der Haut und/oder in anderen Körperorganen sich absiedelnde (metastasierende) maligne Melanom gehören zu den Tumoren, die vom Nervensystem ausgehen; vgl Shamamian et al., 1994, *Cancer Immunol. Immunother.* 39, 73-83; Florenes et al., 1994, *Cancer Research* 54, 354-356. Maligne Melanome stammen aus dem Neuroektoderm, einer embryonalen Anlageschicht. Burg et al., 1997, *Deutsches Ärzteblatt* 94, 890-895, beschreiben einen tumorwachstumshemmenden

Effekt von Tamoxifen für das maligne Melanom. Ferner besitzen Glioblastoma und malignes Melanom gemeinsam verschiedene Tumormarker; vgl. Shamamian et al., 1994, *Cancer Immunol. Immunother.* 39, 73-83; Florenes et al., 1994, *Cancer Research* 54, 354-356. Die Prognose ist im Fall einer Metastasierung sehr schlecht; vgl. Burg et al., 1997, *Deutsches*

-
- 5 Ärzteblatt 94, 890-895.

Zu den Tumoren, die vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten ausgehen, zählen ferner das Neuroblastom und das Medulloblastom, in ihrer Gesamtheit klassifiziert unter den sogenannten primitiven neuroektodermalen Tumoren, abgekürzt PNET. Weiter gehören zu diesen Tumoren das Pinealom, ausgehend vom Pinealis(Zirbeldrüsen)-Parenchym und/oder von primordialen Keimzellen im Pinealisbereich oder in der Hirnmittellinie. Die Zirbeldrüse (Glandula pinealis) ist der Ursprung für die Produktion des Hormons Melatonin, ein GnRH-Rezeptor-Expression stimulierendes Hormon; vgl. Lissoni et. al., 1997, *European Urology* 31, 178-181. Ferner ist die Zirbeldrüse der Ursprung für das Craniopharyngeom (ein β-HCG bzw. 10 LH-ähnliches Peptid produzierender Tumor; vgl. Tachibana et al., 1994, *J. of Neurosurgery* 80, 79-84), das zu den ektodermalen Tumoren gerechnet wird und von der Vorder-/Oberseite der Hypophyse ausgeht.

Sowohl für das Craniopharyngeom als auch das Meningeom, das als ein gutartiger Tumor 20 ausgehend von Arachnoidaldeckzellen angesehen wird und oft fest an der Innenseite der Hirnhaut (Dura mater) haftet, wurden Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren beschrieben. Ferner wurden Androgen-Rezeptoren für das Meningeom nachgewiesen und klinische Studien mit Anti-Progesteron-Arzneimitteln mit tumorschrumpfenden Effekten nachgewiesen.

25 Die bisherige Erprobung weiterer Therapien (verschiedene Chemotherapieformen, Strahlentherapie, etc.) hat in zahlreichen klinischen Studien keine wesentliche Verbesserung der Prognose für Tumore, die vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten ausgehen, erbracht. Zur Zeit besteht die Standardtherapie beim Glioblastoma multiforme nach wie vor aus einer möglichst vollständigen operativen Tumorentfernung und einer anschließenden konventionellen Strahlentherapie. Unter dieser Standardtherapie liegt die 30 statistisch angegebene mittlere Überlebenszeit bei 9-13 Monaten, wobei interindividuelle Schwankungen und insbesonders eine etwas bessere Prognose bei jüngeren Patienten beobachtet wurden.

Ungefähr 30% der Patienten mit rezidivem Glioblastoma multiforme zeigten eine gleichbleibende Größe bzw. ein Schrumpfen des nicht mehr operablen Rest-Hirntumors unter andauernder hoher Dosierung mit Tamoxifen®, einem Anti-Östrogen-Präparat. Dieser tumorhemmende Effekt wird bei der Glioblastoma-Behandlung nicht auf seine anti-östrogene Wirkung, sondern auf seine Hemmung der Proteinkinase-C (einem intrazellulärem Signalüberträger) zurückgeführt; vgl. Puchner et al., Zentralblatt für Neurochirurgie, Supplement 1996, 47. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie, Seite 44. Ferner soll Tamoxifen® die Empfindlichkeit der Tumorzellen sowohl für platinhaltige Chemotherapeutika als auch für die Strahlentherapie erhöhen.

10

Für Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV Astrozytoma) und für Glioma niedrigen Malignitätsgrades (WHO Grad II-IV Astrozytoma) sind Steroidhormon-Rezeptoren in einem geringen Prozentsatz der Fälle festgestellt worden. Eine indirekte anti-proliferative Wirkung bei Glioblastoma multiforme und Glioma Grad II-IV wurde bis jetzt lediglich in etwa 30% der Fälle in klinischen Studien durch Reagieren des Tumors auf Tamoxifen® (ein Anti-Östrogen-Präparat) festgestellt.

Obwohl einige relativ günstige neue Entwicklungen in der Therapie von Glioblastoma multiforme in jüngster Zeit beschrieben wurden, bleibt eine schlechte Prognose quod vitam für Patienten mit Glioblastoma multiforme aufgrund der extrem hohen Rezidivrate trotz bisher erprobter Therapieformen und des Mangels an einer spezifischen gezielten Therapie und Frühdiagnostik weiter bestehen. Die direkte anti-proliferative Wirkung von GnRH-Agonisten auf Glioblastoma multiforme wurde noch nicht beschrieben. Weiterhin war bisher nicht bekannt, daß GnRH-Rezeptoren auf humanen Glioma-Geweben wie Glioblastoma multiforme Geweben vorkommen. Bezug genommen wird auch auf Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 9. Auflage, 1996, Section X, "Chemotherapy of Neoplastic Diseases", Seiten 1225-1287, Verlag McGraw-Hill.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Diagnostika bereitzustellen, die Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten bereits im Frühstadium erkennen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Arzneimittel für die Therapie dieser Tumoren bereitzustellen, die zu einer für alle Patienten besseren Prognose führt.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von

GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten, umfassend: a) Homogenisieren von peroperativ gesammeltem Tumorgewebe, b) Abtrennen der Membranfraktion, c) Bestimmen der Proteinkonzentration in der Membranfraktion von b), d) Bestimmen der GnRH-

- 5 Rezeptorkonzentration in der Membranfraktion von b). Insbesondere betrifft das Verfahren die Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf Gewebe, das von einem Glioblastoma multiforme, Medulloblastom, Pinealom, Neuroblastom, Craniopharyngeom, Meningeom oder malignem Melanom ausgeht.
- 10 Im erfindungsgemäßen Verfahren wird frisches, humanes Tumorgewebe z.B. während einer Hirntumoroperation (peroperativ) gesammelt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die GnRH-Rezeptorbestimmung werden die gefrorenen Gewebeproben zerkleinert und homogenisiert. In einem Zentrifugationsschritt werden die Proben von größeren Gewebetrümmern getrennt. Der Überstand wird erneut zentrifugiert. Das erhaltene
15 Sediment (Pellet) enthält die Membranfraktion, die erneut homogenisiert wird, um eine möglichst homogene Membransuspension zu erhalten. Die Membransuspension wird zur GnRH-Rezeptorbestimmung im Radio-Rezeptor-Assay eingesetzt. Zuvor wird in üblicher Weise, z.B. unter Verwendung des Bio-Rad-Protein-Assay (Bio-Rad, München), die
20 Proteinkonzentration in der präparierten Membranfraktion in bekannter Weise photometrisch bestimmt. Die Bestimmung der GnRH-Rezeptorkonzentration erfolgt unter Verwendung eines bekannten GnRH-Agonisten wie Buserelin, der spezifisch an GnRH-Rezeptoren in der präparierten Membranfraktion bindet. Da der GnRH-Agonist radioaktiv markiert ist, z.B. mit
25 ^{125}I , gibt die Konzentration des gebundenen radioaktiv markierten GnRH-Agonisten die Konzentration der GnRH-Rezeptoren in der Membranfraktion wider. Die Konzentration des gebundenen radioaktiv markierten GnRH-Agonisten wird anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute bestimmt.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Diagnostik-Kits zum Nachweis von GnRH-Rezeptoren zur immunhistologischen Diagnostik, zur Therapieüberwachung, Nachsorge zur
30 Rezidivfrüherkennung während der Nachuntersuchung des immer vorhandenen Residualtumors nach einer Operation z.B. eines Gliomas niedrigen Grades (G II-III WHO; vgl. World Health Organization (WHO) Klassifikation der Tumoren des Zentral- und Peripherervensystems, in: Kleihues et al., 1993, Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo), oder um eine Malignisierung im Sinne eines

04.07.97

8

Glioblastoma multiforme (G IV) festzustellen, und zur Früherkennung in Risikogruppen für eine Durchmusterung auf das Vorkommen von Tumoren z.B. von Glioblastoma multiforme ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten.

-
- 5 Der erfindungsgemäße Kit kann zum Nachweis von GnRH-Rezeptoren auf Zellmembranen oder in Körperflüssigkeiten z.B. Blut, Plasma, Serum, Urin oder Hirnwasser, Gewebeextrakten, Gewebeflüssigkeiten, in vitro-Zellkulturüberständen und Zell-Lysaten verwendet werden. Der GnRH-Rezeptor kann z.B. immunhistochemisch in z.B. operativ entfernten Tumorpräparaten oder Zellkulturen oder mittels eines üblichen Radio-Immun-Assay 10 in z.B. Körperflüssigkeiten bestimmt werden. Der Diagnostik-Kit umfaßt z.B. mono- oder polyklonale Antikörper gegen humane GnRH-Rezeptoren. Der Nachweis von GnRH-Rezeptoren wird in an sich bekannter Weise mit bekannten Immunnachweisen, insbesondere mit Enzym-gebundenen Immunoabsorptionsnachweisen (enzym-linked immunoabsorbent assay; ELISA) oder in einer besonderen Ausführungsform mit dem zuvor beschriebenen 15 Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen durchgeführt.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Glioblastoma multiforme, Medulloblastoms, Pinealoms, Neuroblastoms, Craniopharyngeoms, Meningeoms oder malignen Melanoms. In einer besonderen Ausführungsform sind die GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten mit einem 25 Gonadotropin- bzw. LH-Hemmer z.B. Gossypol® oder mit Melatonin oder einem Melatonin-Analogon (einem Agonisten oder Antagonisten) konjugiert. GnRH-Rezeptoren als auch eine erfindungsgemäße GnRH-Agonist/Antagonist-Behandlung sind bisher weder für das Craniopharyngeom noch für das Meningeom beschrieben worden. Eine Blut-Hirn-Schranke ist bei diesen Tumoren nicht vorhanden, da sie extracerebrale intrakranielle Tumore sind. Daher 30 ist die erfindungsgemäße Therapie mit GnRH-Agonisten und/oder GnRH-Antagonisten bzw. deren Konjugaten vorteilhaft.

Erstmäßig wurde die GnRH-Rezeptor-Konzentration in Zellmembranen von humanen Hirn- oder Nerventumorzellen, d.h. die *in vitro* wirksamen GnRH-Rezeptoren auf der Membran,

mittels Radio-Rezeptor-Assay bestimmt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Bioaktivität bzw. spezifisch die aktiven GnRH-Rezeptoren bestimmt. Dazu wird radioaktiv markiertes Buserelin®, ein GnRH-Agonist, als Marker eingesetzt, der spezifisch an GnRH-Rezeptoren bindet. Anhand der radioaktiven Zerfälle des gebundenen Buserelins® lässt sich die

- 5 GnRH-Rezeptor-Konzentration ermitteln. Dieser Nachweis wird bereits für andere Tumore wie Mammakarzinom und ähnliche eingesetzt. Das erfindungsgemäß verwendete Verfahren bestimmt die GnRH-Rezeptor-Konzentration auf Zellmembran-Extrakten von frischem humanem Tumorgewebe. Es werden keine GnRH-Rezeptor-Konzentration auf Zellmembran-Extrakten von Zelllinien aus Zellkulturen bestimmt.

10 Der genaue Wirkungsmechanismus von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten auf Tumore ist unbekannt. Für die bereits bekannten Tumorarten mit aktiven GnRH-Rezeptoren wie z. B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Ovarialkarzinom wird in der Literatur ein lokal regulatorisches autokrines-parakrines System vorgeschlagen; vgl. Irmer et al., 1995,
15 Cancer Research 55, 817-822. In der Literatur sind für die genannten Tumore anti-proliferative Aktivitäten der GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten beschrieben worden, sowohl *in vitro* (Palyi et al., 1996, Cancer Detection and Prevention 20, 146-152; Irmer et al., 1995, Cancer Research 55, 817-822; Pati et al., 1995, Endocrinology 136, 75-84) als auch *in vivo* bzw. klinisch; vgl. Gonzalez-Barcena et al., 1994, The Prostate 24, 84-92; Jonat et al.,
20 1995, European J. of Cancer 31A, 137-142; Emons und Schally, 1994, Human Reproduction Update 9, Nr. 7, 1364-1379. Diese anti-proliferative Aktivität geht dabei über den zu erwartenden anti-proliferativen Effekt im klinischen Bereich vom Effekt der vorübergehenden "chemischen Kastration" durch GnRH-Agonisten aus.

- 25 Für Glioblastoma und Glioma kommt in gleicher Weise folgender Wirkungsmechanismus in Betracht. In der Literatur (Constam et al., 1992, J. Immunology 148, 1404-1410) wird die Produktion von Transforming Growth Factor β (TGF- β) durch Glioblastoma-Zellen beschrieben. Der Wachstumsfaktor TGF- β wird von Melcangi et al., 1995, Endocrinology 136, 679-686, als ein Produkt von Ratten-Gliazellen, d.h. normale, Nichttumorzellen, beschrieben, der als Faktor *in vitro* die natürliche GnRH-Produktion in Hypothalamuszellen anregt. Postuliert wird, daß das örtlich (lokal) durch Glioblastoma produzierte und sezernierte GnRH eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum des Tumors hat, was ebenfalls für TGF- β bekannt ist. Auch humane Glioblastomazellen bzw. Gliomazellen können zirkulierende immunsuppressive Substanzen sezernieren, vor allem TGF- β , und somit eine Beeinträchtigung

zellulärer Immunreaktionen induzieren. Die Zunahme von TGF- β hat also wahrscheinlich außer einer GnRH-Produktion stimulierenden Funktion auch einen immunsuppressiven (abwehrhemmenden) Effekt auf die zelluläre Immunität des Patienten, wodurch das Tumorwachstum gefördert wird und die Tumogröße zunimmt. Für Glioblastoma multiforme,

- Medulloblastom und malignes Melanom wurde dieses immunsuppressive Phänomen von TGF-
 β beschrieben; vgl. Stockhammer et al., 1995, J. of Neurosurgery 83, 672-681; Jennings et al.,
1994, Hum. Pathol. 25, 464-475; Bzik et al., 1996, J. Cell Biochem. 62, 113-122; van Belle
et al., 1996, Am. J. Pathol. 148, 1887-1894. Dieses autokrin-parakrin wachstumsregulierende

System lässt sich auch umkehren, was eine Abnahme der Tumogröße zur Folge hat. Diese
 10 Umkehrung (in der Endokrinologie "negatives Feedback" genannt) kann man im Prinzip mittels
 eines Überschusses an GnRH bewirken (kompetitive Inhibition). Dieser Effekt wird durch
 GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten an Stelle von GnRH noch verstärkt. Die Folge
 dieser Therapie ist eine Abnahme der TGF- β Produktion und eine daraus folgende Abnahme
 der Tumogröße.

- 15 Erfindungsgemäß werden erstmalig GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels bereitgestellt, um Tumore ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten zu behandeln.

- 20 Die GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten und die konjugierten GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten dienen erfindungsgemäß zur Behandlung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten z.B. eines Glioblastoma multiforme. Die Arzneimittel der Erfindung können in jeder dem Fachmann bekannten Art und Weise hergestellt werden, insbesondere zur subkutanen, intramuskulären, intravenösen, intraspinalen bzw. subduralen oder intranasalen Applikation oder in Form eines Depot-Implantats. Die Arzneimittel der Erfindung können ebenfalls über ein subkutanes, ventrikuläres Cytostatikareservoir mit Verbindung zum Ventrikel verabreicht werden, wobei man durch die Haut hindurch das Reservoir mit Injektionen auffüllen kann. Die GnRH-Agonisten können in der gleichen Dosierung verabreicht werden, die z.B. für die Behandlung von Prostata-,
 25 Mammacarcinom oder Endometriose eingesetzt werden; vgl. z.B. Rote Liste, 1997, Abschnitt 50, Teil 3, Hypothalamushormone, 50038 bis 50056, Herausgeber ROTE LISTE® Service GmbH, Frankfurt/Main, auf die die hier ausdrücklich Bezug genommen wird; vgl. Annex A.
 Die minimale Dosierung entspricht der in der Roten Liste für die jeweiligen GnRH-Agonisten angegebenen Dosis. Bei z.B. der intraspinalen oder subkutanen, ventrikulären Verabreichung

über ein Cytostatikareservoir kann die minimale Dosierung niedriger sein, als in der Roten Liste für die jeweiligen GnRH-Agonisten angegeben ist. Die maximale Dosierung entspricht dem LD₅₀-Wert für die entsprechenden GnRH-Agonisten. Die Dosierung kann gegebenenfalls nach einem neurologisch erhaltenen Befund der GnRH-Rezeptor-Konzentration erhöht oder

5 erniedrigt werden. Die Häufigkeit der Applikation bzw. die Tagesdosis kann ebenfalls der Roten Liste entnommen werden. Die Arzneimittel werden vorzugsweise bis zur kompletten Remission (Rückbildung) des Tumors, die neuroradiologisch und klinisch festgestellt werden kann, verabreicht.

10 Zur subkutanen Verabreichung können z.B. Carcinil®, Decapeptyl® 0,5 mg/0,1 mg oder Uno-Enantone eingesetzt werden. Als Depot-Implantate können z.B. Profact®-Depot, Zoladex® oder Enantone Monatsdepot verabreicht werden. Zur intramuskulären Verabreichung können z.B. Decapeptyl®-Depot, Decapeptyl®-Gyn oder Enantone-Gyn eingesetzt werden. Zur intranasalen Verabreichung können z.B. Profact®-Nasal, Suprecur®-Nasal oder Synarel®-Nasal eingesetzt werden. Die GnRH-Antagonisten können in der Dosierung verabreicht werden, die z.B. für Cetrolix® in Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92, angegeben ist.

15

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als beschränkend aufzufassen.

20

Beispiele:

1. Die Sammlung von Gliomagewebe.

25 Während Hirntumoroperationen (peroperativ) wurde frisches, humanes Tumorgewebe trocken in einem sterilen Schälchen ohne Zufügung von Medium gesammelt und sofort in ein steriles Standard-Plastikrörchen überführt. Das Rörchen wurde luftdicht verschlossen und etwa 15 Minuten in einem Dewar-Gefäß (Union Carbide Cryogenic Equipment 35HC, Serien-Nr. 103-139-T5), das flüssigen Stickstoff enthielt, schockgefroren. Die Gewebeproben wurden etwa 2 Monate in flüssigem Stickstoff bis zur GnRH-Rezeptorbestimmung aufbewahrt.

30

2. Gewebeaufarbeitung:

Die gefrorenen Gewebeproben wurden von Blut- und Fettresten befreit und mit einem Skalpell in ca. 2 x 2 x 2 mm große Stücke zerschnitten. Die Gewebeproben wurden 1 Minute bei

04.07.97

maximaler Leistung in einem Dismembrator II (B. Braun, Melsungen) homogenisiert. Das homogenisierte Gewebe wurde in 1000 µl kaltem Puffer 1 (10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,4, 4°C) aufgenommen und möglichst homogen durchmischt. In einem ersten Zentrifugationsschritt (800 x g, 10 Minuten, 4°C) wurde die Probe von größeren

5 Gewebetrümmern getrennt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (10.000 x g, 45 Minuten, 4°C). Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschritts wurde verworfen und das Pellet, das die Membranfraktion enthielt, in 1000 µl kaltem Puffer 1 aufgenommen und mit einem Polytron-Homogenisator dreimal je 4 Sekunden homogenisiert, um eine möglichst homogene Membransuspension zu erhalten. Zu dieser Membranfraktion wurden 1000 µl kalter Puffer 1
10 zugesetzt. Diese Suspension wurde zur GnRH-Rezeptorbestimmung im Radio-Rezeptor-Assay eingesetzt.

3. Proteinkonzentrationsbestimmung

15 Das Bio-Rad-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. 3,5 ml dieses Reagenz wurde mit 50 µl der präparierten Membranfraktion gemischt und 10 Minuten inkubiert. Die photometrische Messung der Proteinkonzentration erfolgte als Zweifachbestimmung bei 595 nm in bekannter Weise. Als Proteinstandard diente ein Humanalbumin-Proteinstandard, mit dem in entsprechender Weise die Messungen ausgeführt
20 werden.

4. Der Radio-Rezeptor-Assay

Die Bestimmung der GnRH-Rezeptorkonzentration erfolgte in der wie vorstehend beschriebenen präparierten Membranfraktion des Gewebes. Der Radio-Rezeptor-Assay umfaßte zwei verschiedene Probenansätze, die jeweils vierfach bestimmt wurden: (a) Probenansätze mit der präparierten Membranfraktion und (b) Kontrollansätze.
25

a) zu 100 µl Membranfraktion wurden 300 µl Puffer 2 (10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,4, 0,1% Rinderserumalbumin) und 100 µl Tracer (¹²⁵I-Buserelin, 80.000 cpm/100µl) zugesetzt.
30

b) für die Kontrollen wurden 250 µl Puffer 2, 100 µl Tracer, 100 µl Membranfraktion und 50 µl GnRH-Analogon (10^3 M Buserelin) vermischt.

Die einzelnen Proben wurden dann gut durchmischt und anschließend 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Radio-Rezeptor-Assay wurde durch Zugabe von 500 µl Rindergammaglobulinlösung (0,1% Rindergammaglobulin, 0,15 M NaCl) gestoppt. Danach wurden 1000 µl einer 0,25% PEG-6000, 0,15 M NaCl-Lösung zugesetzt.

5

- Die Proben wurden nochmals homogen durchmischt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Abtrennung der PEG-Hormon-Rezeptor-Komplexe erfolgte mit einem Zentrifugationsschritt (1.600 x g, 30 Minuten, 4°C), bei dem die Komplexe aufgrund ihrer höheren Masse das Pellet bilden. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die Anzahl der 10 Zerfälle pro Minute, die als Basis für die Berechnung des GnRH-Rezeptor-Gehalts dienten, wurde anschließend mit einem Gamma-Counter (Berthold) gemessen.

5. Überprüfung des Radio-Rezeptor-Assays

- 15 Gewöhnlich wurden mehrere Gewebeproben in einem Versuchsansatz untersucht. Zum Ausschluß eines systematischen Fehlers bei einem negativen Ergebnis aller Proben in einem Assay, wurde bei jedem Assay eine Standardprobe aus Rinder-Hypophysengewebe parallel zu den Tumorgewebeproben untersucht. Der Nachweis von GnRH-Rezeptoren in Rinder-Hypophysengeweben diente somit als Positivkontrolle. Das Hypophysengewebe wurde wie die 20 Tumorgewebeproben aufgearbeitet und die Membranfraktion in der gleichen Weise gereinigt.

6. Berechnung des GnRH-Rezeptorgehalts

- 25 Die Berechnung des GnRH-Rezeptorgehalts (fmol/mg Membranprotein) erfolgte aufgrund der Anzahl der Zerfälle pro Minute (cpm), der spezifischen Bindung, der eingesetzten Proteinmenge und der spezifischen Aktivität des radioaktiv markierten Liganden.

- 30 Die spezifische Bindung (B_{spez}) ergibt sich aus der Differenz des Mittelwerts der Vierfachbestimmung der Gesamtbinding (B_0) und des Mittelwerts der Vierfachbestimmung der unspezifischen Bindung (NSB).

Die eingesetzte Proteinmenge wird, wie vorstehend bei Ziffer 3 dargestellt, photometrisch bestimmt.

OK-07-97

Daten des Analogons ^{125}I -Buserelin:

MG: 1253 g/mol

Spezifische Aktivität: 1470 mCi/mg

~~5 Aktivität der ^{125}I -Buserelin-Lösung: 20 $\mu\text{Ci/ml}$~~ - 1470 mCi/mg ^{125}I -Buserelin = $54,4 \times 10^9 \text{ Be/mg}$ - 4 ml ^{125}I -Buserelin-Lösung beinhalten $13,61 \times 10^{-9} \text{ g}$ ^{125}I -Buserelin mit $7,4 \times 10^6 \text{ Bq}$ - $13,61 \times 10^{-9} \text{ g/ml}$ ^{125}I -Buserelin = $10,9 \times 10^{12} \text{ Mol}$ ^{125}I -Buserelin. $54,4 \times 10^9 \text{ Bq} = 44,4 \times 10^7 \text{ cpm}$ 10 - $10,9 \times 10^{12} \text{ Mol}$ ^{125}I -Buserelin = $44,4 \times 10^7 \text{ cpm}$ - 1000 cpm entsprechen $0,247 \times 10^{15} \text{ Mol}$ ^{125}I -Buserelin

Zur Berechnung der GnRH-Rezeptorkonzentration (fmol/mg Membranprotein) aus den gemessenen cpm-Werten, muß nun noch die eingesetzte Proteinmenge und der Zerfallsfaktor berücksichtigt werden. Die Formel zur Berechnung des GnRH-Rezeptorgehalts lautet somit:

$$\frac{0,247 \times 10^{15} \text{ Mol} \text{ } ^{125}\text{I}-\text{Buserelin}}{\text{Zerfallsfaktor} \times \text{Proteinmenge}} = 1000 \text{ cpm}$$

04.07.97

Ausführungsbeispiel**Bestimmung der GnRH-Rezeptorkonzentration**

5 Aufgeführt sind Ergebnisse der GnRH-Rezeptor-Bestimmung mit dem erfundungsgemäßigen Radio-Rezeptor-Assay von Gewebeproben verschiedener Patienten.

Histologieproben	ER fmol/mg/Prot	PgR fmol/mg/Prot	GnRH-Rez atomol/mg/Prot	Befund
	10	20	1000	negativ
	10-20	20-30	1000-3000	schwach positiv
	20	30	3000-5000	positiv
	50	100	5000	stark positiv
Chordom	1	1	708	
GBM	1	2	2478	
GBM	1	1	895	
GBM	1	1	1111	
Gliom G II	1	1	3635	
Meningeom	1	74	1	
Adenocarcinom	1	1	1	
GBM	1	1	7357	
Fibrillär				
Astrozytom G II	1	1	1	
Meningeom	1	177	7444	
Meningeom	1	550	1588	
GBM	1	1	4466	

ER=Östrogen-Rezeptor, PgR=Progesteron-Rezeptor, GnRH-Rez=GnRH-Rezeptor

04.07.97

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den

- 5 Hirnhäuten. Ferner betrifft die Erfindung die Bereitstellung eines Diagnostik-Kits für Tumore ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten.



Patentansprüche

1. Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten
5 Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten,
umfassend:

- a) Homogenisieren von peroperativ gesammeltem Tumorgewebe,
- b) Abtrennen der Membranfraktion,
- 10 c) Bestimmen der Proteinkonzentration in der Membranfraktion von b),
- d) Bestimmen der GnRH-Rezeptorkonzentration in der Membranfraktion von b).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Gewebe von einem Glioblastoma multiforme,
Medulloblastom, Pinealom, Neuroblastom, Craniopharyngeom, Meningeom oder malignem
15 Melanom stammt.

3. Diagnostik-Kit zum Nachweis von GnRH-Rezeptoren zur immunhistologischen
Diagnostik, zur Therapieüberwachung, Nachsorge zur Rezidivfrüherkennung und zur
Früherkennung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den
20 Hirnhäuten.

4. Diagnostik-Kit nach Anspruch 6, umfassend die Verwendung des Verfahrens nach
Anspruch 1 oder 2.

5. Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines
Arzneimittels zur Behandlung eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem
und/oder den Hirnhäuten.

6. Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines
30 Arzneimittels zur Behandlung eines Glioblastoma multiforme, Medulloblastoms, Pinealoms,
Neuroblastoms, Craniopharyngeoms, Meningeoms oder malignen Melanoms.

7. Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten nach Anspruch 3 oder 4,
wobei die GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten mit einem Gonadotropin- bzw. LH-
35 Hemmer oder mit Melatonin oder einem Melatonin-Analogon konjugiert sind.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.